

ÉTUDE PHYLOGÉNÉTIQUE DES LEVURES DU GENRE *ZYGOSACCHAROMYCES*

E. CHRZAVZEZ et R. AUFRÈRE

IGM. Bât 409, Université Paris sud, 91 405 Orsay cedex.

RÉSUMÉ - Une étude phylogénétique des levures du genre *Zygosaccharomyces* ■ été entreprise dans le cadre de la mise au point d'un test de détection de *Z. bailii*. L'étude phylogénétique repose sur la comparaison de séquences partielles du 18S. Ainsi les séquences nucléotidiques des domaines v3, v4 et v9, régions variables du 18S, ont été déterminées par séquençage direct après PCR pour différentes espèces: *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. cidri*, *Z. fermentati*, *Z. florentinus*, *Z. mrakii*. Les séquences de *Z. rouxii* et *Z. mellis* utilisées sont issues de la littérature. L'alignement de ces séquences entre elles puis avec celles d'autres micro-organismes ont permis d'obtenir des arbres phylogénétiques en utilisant les méthodes de parcimonie et de distance. Les arbres obtenus montrent que certaines espèces sont très proches, comme: *Z. bailii* et *Z. bisporus*, *Z. rouxii* et *Z. mellis*, *Z. cidri* et *Z. fermentati*, *Z. florentinus* et *Z. mrakii*. *Z. microellipsoides* et *Torulaspota delbruckii* partagent un ancêtre commun et semblent n'avoir que très peu divergé. *Z. cidri* et *Z. fermentati* partagent un ancêtre commun avec *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT - The phylogenetic interrelationship of species of the genus *Zygosaccharomyces* was examined by partial 18S rRNA sequencing. Sequences of seven species of this genus were obtained after a PCR amplification of the three variable v3, v4 and v9 domains. Species of the genus are clustered in two distinct groups. The first one comprises the *Z.rouxii*, *Z. mellis* pair and the *Z. bailii*, *Z. bisporus* pair. The second one is devised in two subgroups that have recently diverged.

INTRODUCTION

Par son exceptionnelle tolérance aux conservateurs, aux acides faibles ainsi que par ses caractères osmophiles, *Zygosaccharomyces bailii* est capable de contaminer de nombreux produits alimentaires (Thomas & Ravenport, 1985). Cette levure, connue comme contaminant majeur des vins (Rankine & Pilone, 1973), a aussi été isolée dans les concentrés de fruits, les sirops, le ketchup, la margarine et les assaisonnements pour salade ... (Sand, 1977); elle est par là même un problème d'importance pour les industries agro-alimentaires. Il est nécessaire pour le monde de l'industrie d'être capable de contrôler un tel fléau. Ainsi l'association UNIR (Ultra Propre Nutrition Industrie Recherche) a incorporé dans son programme "Usine ultra propre" la mise au point d'un test de détection rapide de *Z. bailii*, avec pour système modèle la confiture de fraise. La cible du test de détection est l'ADN génomique de la levure *Z. bailii*. Une région poly-

morphe du génome est amplifiée à l'aide d'un couple d'oligonucléotides amorce spécifique. La région cible est l'ADN ribosomique. L'unité ribosomique est constituée de régions très conservées codant les ARN 18S, 5.8S et 28S ainsi que de régions espacées transcrites (ITS1 et ITS2) et non transcrites (IGS) réputées très polymorphes. C'est à l'intérieur des ITS1 et ITS2 que sont choisis les oligonucléotides amorce. Pour cela les séquences nucléotidiques de ces régions ont été déterminées, et leur polymorphisme étudié. La spécificité du couple d'amorce défini doit être vérifiée en testant différents micro-organismes plus ou moins proches du point de vue de leur parenté phylogénétique. C'est en essayant de choisir les espèces proches de *Z. bailii* qu'émerge la difficulté de la classification du genre *Zygosaccharomyces* en particulier et des levures en général. Par conséquent il apparaissait nécessaire d'entreprendre une étude phylogénétique concernant le genre *Zygosaccharomyces* de manière à mieux le situer par rapport aux autres micro-organismes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les souches de levure

Les souches utilisées ainsi que leurs origines sont répertoriées dans le tableau 1. Les levures sont cultivées sur milieu contenant 1,8% d'agar, 1% d'extrait de levure, 1% de bactopeptone, 2% de glucose à 25°C.

Extraction rapide d'ADN génomique

Les cellules sont prélevées sur boîte, et mises en suspension en tampon Tris-HCl 50 mM pH8,5, EDTA 20 mM, SDS 0,6%, puis sont soumises à ébullition pendant 15 mn. Le surnageant dilué 10 fois dans l'eau est utilisé pour la réaction d'amplification.

Tableau I - Espèces du genre *Zygosaccharomyces* utilisées dans cette étude.

Table I - *Zygosaccharomyces* strains used in this study.

Espèce	n° de la souche.
<i>Z. bailii</i> (Lidner) Guilliermond	DBVPG 6287 ^T
<i>Z. bisporus</i> Naganishi	DBVPG 6382 ^T
<i>Z. cidri</i> (Legakis) Yarrow	DBVPG 6385 ^T
<i>Z. fermentati</i> Naganishi	DBVPG 6297 ^T
<i>Z. florentinus</i> Castelli ex Kudriavzev	DBVPG 6186 ^T
<i>Z. microellipsoides</i> (Osterwalder) Yarrow	DBVPG 6188 ^T
<i>Z. mrakii</i> Capriotti	DBVPG 6289 ^T 1 ¹ MUCL 31151

^T Souche type (type strain).

DBVPG: Dipartimento di Biologia Vegetale, Perugia, Italy.

MUCL: Mycothèque de l'université catholique de Louvain, Belgium.

Oligonucléotides amorces

Les amorces utilisées pour l'amplification ont été déterminées selon Hausner *et al.* (1992) et sont décrites dans le tableau 2. Les combinaisons SSF-SSG et SSU-SST permettent l'amplification des domaines v3-v4 et v9 respectivement. La séquence nucléotidique des régions v3 et v4 est déterminée pour chaque brin avec les amorces SSF et SSU dans un sens et SSg1 et SSG dans l'autre sens. Les amorces SS5 et SST sont utilisées pour déterminer la séquence nucléotidique des deux brins du domaine v9.

Réaction d'amplification

L'amplification est faite dans un volume final de 100ml contenant 20mM Tris-HCl, pH 8,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16mM, MgCl_2 2,5mM, 150mg de serum albumine bovine, 0,2mM de chaque dNTP et 100mM de chacun des oligonucléotides amorce. Deux unités de Taq DNA polymérase (BioTaq, Bioprobe Systems, France) sont utilisées par réaction. Trente cycles de réaction sont effectués dans le thermocycler BIO-med 60, avec les paramètres suivants: 50s à 94°C pour la dénaturation, 50s d'hybridation à 51°C, 1 mn 30s d'élongation à 72°C puis une étape d'extension finale de 10 mn à 72°C. Chaque réaction est recouverte d'huile minérale (BDH, UK). Chaque produit de réaction est purifié sur les colonnes Wizard PCR preps (Promega, Madison, USA).

Analyse des séquences

Les séquences obtenues ainsi que d'autres accessibles dans les banques (EMBL/GenBank), *Torulasporea delbruckii* (n° d'accès v01335), *Candida kefyr* (M60303), *Candida glabrata* (X51831), *Zygosaccharomyces rouxii* (X58057) et *Z. mellis* (publiée par James *et al.*, 1994), sont alignées grâce au programme Clustal (Higgins & Sharp, 1989). L'alignement multiple obtenu est utilisé pour construire des arbres phylogénétiques en utilisant les différents programmes inclus dans l'ensemble PHYLIP (Felsenstein, 1993, version 3.5c). Des arbres, par la méthode de parcimonie et par la méthode des distances sont obtenus grâce aux programmes DNAPARS et NEIGHBOR. La force des noeuds est calculée dans chaque cas par le programme SEQBOOT.

Tableau 2 - Oligonucléotides amorces utilisés pour amplifier et/ ou séquencer les domaines variables v3, v4 et v9 de la petite sous-unité ribosomique.

Table 2 - Primers used to amplify and/or sequence regions within the SSrRNA gene.

Amorce	Position de l' oligonucléotide ¹	Séquence (5' vers 3')
*SSF	396-394	GATTCGGAGAGGGAGCC
*SSU	576-594	GTAATTCAGCTCCAATAGC
SSg1	623-642	CCCAAAGTTCAACTACGAG
*SSG	894-914	CCAAGAATTTCACCTCTGAC
*SS5	1522-1542	GTGCTGGGGATAGAGCATTG
*SST	1744-1764	ACGGAACCTTGTTACGACT

* Décrit par Hausner *et al.* 1992

¹ Numérotation faite par rapport à *Saccharomyces cerevisiae*.

¹ *Saccharomyces cerevisiae* numbering.

RÉSULTATS DISCUSSION

L'étude phylogénétique repose sur l'étude des séquences partielles codant l'ARN 18S ou petite sous-unité ribosomique. Il a été montré que l'emploi de séquences partielles était suffisant pour ce genre d'étude (Mac Caroll, 1983; Lane, 1985). Le 18S est réputé être très conservé dans le monde vivant et permet de comparer une palette assez large de micro-organismes. De plus, les différentes régions du 18S connaissent des vitesses d'évolution variables. Ainsi apparaissent des régions comme les domaines v3, v4 et v9 qui évoluent un peu plus rapidement que les autres. Dans le cas présent il s'agit d'étudier des micro-organismes relativement proches, il est donc préférable de sélectionner des régions variables afin d'obtenir suffisamment de sites informatifs. Les séquences nucléotidiques des régions v3, v4 et v9 ont été déterminées directement après amplification en chaîne par polymérisation. Les séquences obtenues ont été alignées (Figure 1) et comparées aux séquences d'autres micro-organismes comme *Torulaspota delbruckii*, *Candida glabrata*, *C. kefyri* et *Saccharomyces cerevisiae*. Alors que cette étude était terminée, nous avons eu connaissance de travaux similaires effectués par James et al (1994). Les séquences obtenues par cette équipe ont été comparées à celles obtenues dans notre laboratoire. Elles étaient toutes identiques mis à part celles de *Z. mrakii*, pour laquelle nous avons à nouveau déterminé la séquence nucléotidique à partir d'une nouvelle souche type provenant d'une autre collection. La séquence obtenue était la même que celle obtenue la première fois.

L'alignement multiple des séquences a été analysé à l'aide des programmes NEIGHBOR et DNAPARS. La force des noeuds a été calculée par bootstrap. Les résultats obtenus par l'analyse en distance (plus proches voisins) et par la méthode de parcimonie sont représentés sur les figures 2 et 3. Excepté dans le cas de *C. glabrata*, les arbres obtenus par les méthodes de distance et de parcimonie génèrent des arbres phylogénétiques semblables. Deux groupes distincts émergent clairement. *C. kefyri* se branche sur l'ancêtre le plus éloigné. Dans le premier groupe deux paires de micro-organismes très proches (*Z. rouxii* et *Z. mellis*, *Z. bailii* et *Z. bisporus*) partagent un ancêtre commun. Le second groupe peut être divisé en deux sous-groupes. Dans le premier sous-groupe la paire *Z. cidri*, *Z. fermentati* qui partage un ancêtre commun avec *S. cerevisiae*; ce triplet a un ancêtre commun avec *T. delbruckii* et *Z. microellipsoïdes* qui n'ont pas divergé de cet ancêtre commun. Dans le second sous-groupe, la paire *Z. mrakii*, *Z. florentinus* est branchée sur le même noeud que *C. glabrata* dans le cas de l'étude en parcimonie. Bien que deux groupes émergent, toutes ces espèces n'ont certainement divergées que récemment. Ces résultats montrent que *T. delbruckii* et *Z. microellipsoïdes*, bien que portant des noms de genre différents sont très proches, et souligne ainsi l'existence des problèmes inhérents à la classification des levures.

Une telle étude reste limitée par le nombre de séquences disponibles dans les banques, mais elle évoluera avec l'apport d'autres séquences nucléotidiques. Cette étude nous aura permis de montrer que le genre *Zygosaccharomyces* n'est pas monophylétique mais que l'ensemble des espèces qui le constituent sont proches de *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, l'étude de la spécificité de la sonde passe par le test de levures proches de *Saccharomyces cerevisiae*, espèce bien définie phylogénétiquement.

REMERCIEMENTS:

Nous sommes reconnaissants à Mme Martini (DBVPG, Perugia, Italie) qui nous a fourni les souches de *Zygosaccharomyces*, et à Mme Roquebert (Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, France) pour la lecture critique du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- HIGGINS, SHARP, 1989 - Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Cabios*, 5: 151-153.
- JAMES S.A., COLLINS M.D. and ROBERTS I.N., 1994 - Generic Interrelationship Among Species of the Genus *Zygosaccharomyces* as Revealed by Small-Subunit rRNA Gene Sequences. *Yeast*, 10: 871-881.
- LANE D.J., PACE B., OLSEN G.J., STAHL D.A., SOGIN M.L. and PACE N.R., 1985 - Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 82: 6955-6959.
- McCARROLL R., OLSEN G.J., STAHL Y.D., WOESE C.R. and SOGIN M.L., 1983 - Nucleotide Sequence of the *Dictyostelium discoideum* Small-Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid Inferred from the Gene Sequence: Evolutionary Implications. *Biochemistry*, 22: 5858-5868.
- RANKINE B.C. and PILONE D.A., 1973 - *Saccharomyces bailii*, a resistant yeast causing serious spoilage of bottled table wine. *Amer. J. Enol. Viticult.*, 24: 55-58.
- SAND F.E.M.J., 1977 - Spoilage of fountain syrup by *Saccharomyces bailii*. *Brauwelt Jg.* 8: 238-243.
- THOMAS D.J., DAVENPORT R.R., 1985 - *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*, 2: 157-169.

A Domaine V3

S.cerev	CCAAGGAAGG CAGCAGGGCG	GCAAATTACC	CAATCCTAAT	TCAGGGAGGT
Z.bailliiA.TA.....
Z.bisporusA.TA.....
Z.cidriA.TT.....
Z.fermentA.TT.....
Z.florentA.TA.....
Z.microA.TA.....
Z.mrakiiA.TA.....
Z.rouxiiG.CA.....
S.cerev	ACTGACAATA AATAACGATA	CAGGGCCCAT	TCGGGTCTTG	TAATGGAAAT
Z.bailliiT. ACA.....
Z.bisporusT. ATA.....
Z.cidriA. TCA.....
Z.fermentA. ACA.....
Z.florentA. ACA.....
Z.microA. TCA.....
Z.mrakiiA. ACA.....
Z.rouxiiT. ACA.....
S.cerev	GAGTACAATG TAAATACCTT	AACGAGGAAC	AATTGGAGGG	CAAGTCTGGT
Z.baillii
Z.bisporus
Z.cidri
Z.ferment
Z.florent
Z.micro
Z.mrakii
Z.rouxii
S.cerev	GCCA-GCAGC CGCGSTAATT	CCAGCTCCAA	TAGCGTATAT	TAAAGTTGTT
Z.baillii
Z.bisporus
Z.cidri
Z.ferment
Z.florent
Z.micro
Z.mrakii
Z.rouxii

Domaine V4

S.cerev	GCAGTAAAA AGCTCGTAGT	TGAACCTTGG	GCCCGGTGG	CCGSTCCGAT
Z.bailliiT..C..GA
Z.bisporusT..C..GA
Z.cidriT..T..AT
Z.fermentT..T..AT
Z.florentT..T..AT
Z.microT..T..AT
Z.mrakiiT..T..AT
Z.rouxiiT..C..GA
S.cerev	TTTT--CG TGTACTGA	TFT---CCAA	CGGGCCCTTT	CCTTCTGGCT
Z.baillii	TCT...C... T.....T	TPTAATT-CG.	.C.....
Z.bisporus	TCT...C... T.....T	TPTAATTTCG.	.C.....
Z.cidri	TFT...T... T.....A	T-----CCA.	.C.....
Z.ferment	TFT...T... T.....A	T-----CCA.	.C.....
Z.florent	TFT...T... T.....T	---AC-CCA.	.C.....
Z.micro	TFT...T... T.....T	TT-----CCA.	.C.....
Z.mrakii	TFT...T... T.....T	---GTTCCA.	.C.....
Z.rouxii	TFT...C... C.....T	TFT---TCCG.	.C.....
S.cerev	AACC-TT-GAGT CCTTG-TGGC	TCT--TGGCG	AACCAGGACT	TTTACTTT
Z.baillii	.G...CT.GGGTC	CCT-.....
Z.bisporus	.G...CT.GGGTC	CCT-.....
Z.cidri	.A...TT.GGGCT	CCT-.....
Z.ferment	.A...TT.GGGCT	CCT-.....
Z.florent	.A...CG.TGTCG	CGCG.....
Z.micro	.A...TT.GGGTC	CCT-.....
Z.mrakii	.A...CG.TGCTG	CGCG.....
Z.rouxii	.G...CT.GGGTC	CCT-.....

S.cerev	GAAAAAATTA	CAGTGTCAA	AGCAGGC--G	TATTGCTCGA	ATATATTAGC	
Z.bailliiT
Z.bisporusT
Z.cidriA
Z.fermentA
Z.florentTA
Z.microTA
Z.mrakiiTA
Z.rouxiiTA

S.cerev	ATGGAATAAT	AGAATAGGAC	GTTTGGTCT	ATTTTGTGG	TTTCTAGGAC	CA
Z.bailliiA
Z.bisporusG
Z.cidriG
Z.fermentG
Z.florentG
Z.microG
Z.mrakiiG
Z.rouxiiG

B Domaine V9

S.cerev	ATTCCTAGTA	AGCGCAAGTC	ATCAGCTTGC	GTTGATTACG	TCCCTGCCCT	
Z.bailliiA
Z.bisporusA
Z.cidriG
Z.fermentG
Z.florentG
Z.microG
Z.mrakiiA
Z.rouxiiG

S.cerev	TTGTACACAC	CGCCCGTCGC	TAGTACCGAT	TGAATGGCTT	AGTGAGGCCCT	
Z.baillii
Z.bisporus
Z.cidri
Z.ferment
Z.florent
Z.micro
Z.mrakii
Z.rouxii

S.cerev	CAG-GATCTG	CTTAGAGAAG	GGGGCAACTC	CATCT-CAGA	GCGGAGAATT	
Z.bailliiCATC
Z.bisporusCATC
Z.cidriTATC
Z.fermentTATC
Z.florentCGCC
Z.microCATC
Z.mrakiiCGCC
Z.rouxiiCATC

S.cerev	TGGACAAAC	TT
Z.bailliiA
Z.bisporusT
Z.cidriT
Z.fermentT
Z.florentT
Z.microT
Z.mrakiiT
Z.rouxiiT

Figure 1 - Aligment des domaines v3, v4 et v9 du 18S. Les points indiquent que le nucléotide est identique à celui de la souche de référence, *Saccharomyces cerevisiae*, les tirets indiquent qu'il n'y a pas de base présente à cette position.

Figure 1 - Alignment of SSrRNA partial sequences. Dots indicate nucleotide identical to the reference species (*Saccharomyces cerevisiae*), dashes show no base present at this position.

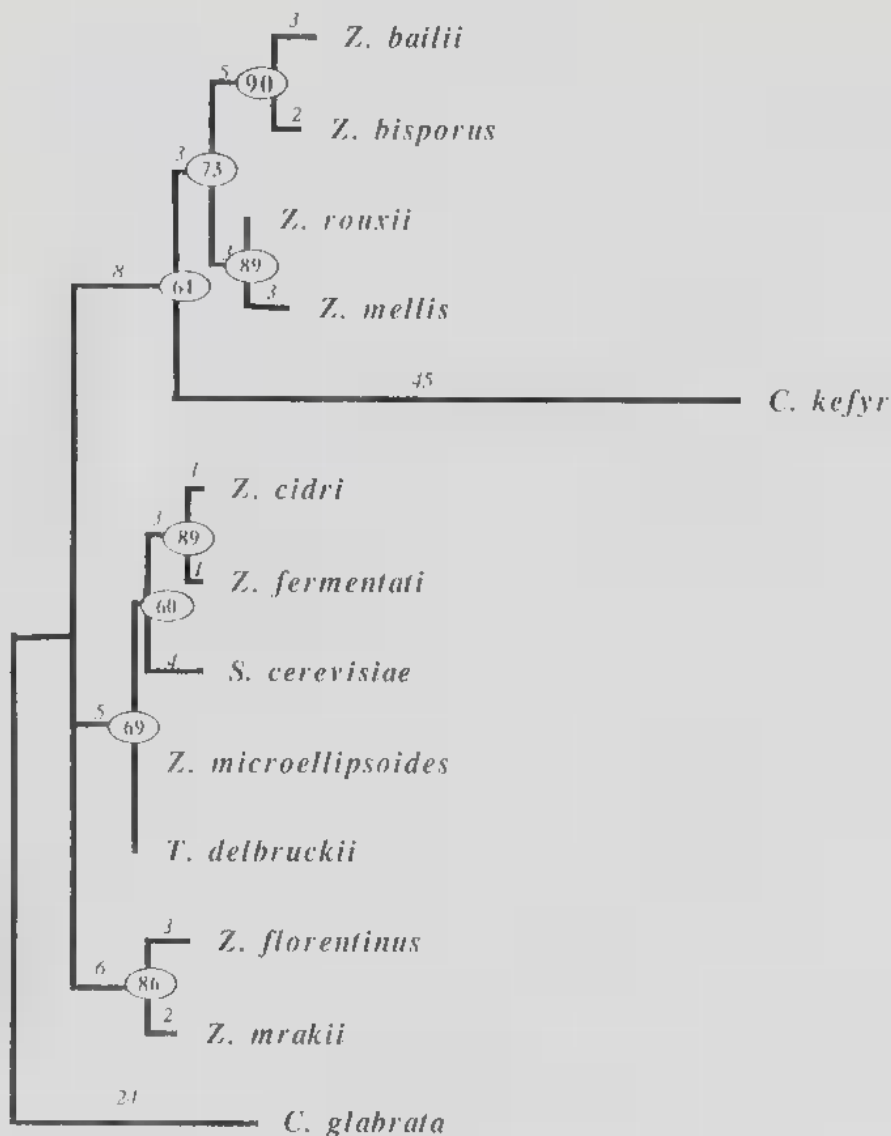


Figure 2 - Arbre phylogénétique obtenu en parsimonie. Les chiffres encadrés indiquent la force des noeuds définie par bootstrap. La longueur des branches calculée par le programme PAUP est indiquée en italique. *C. glabrata* et *C. kefyr* ont été choisis comme groupe externe.

Figure 2 - Phylogenetic tree obtained with the parsimony method. Numerals within circle indicate the node strength defined by bootstrap test. The branch lengths, calculated within the PAUP program, are drawn to scale and indicated by numbers in italics. Tree were rooted by taking *C. glabrata* and *D. kefyr* as outgroup.

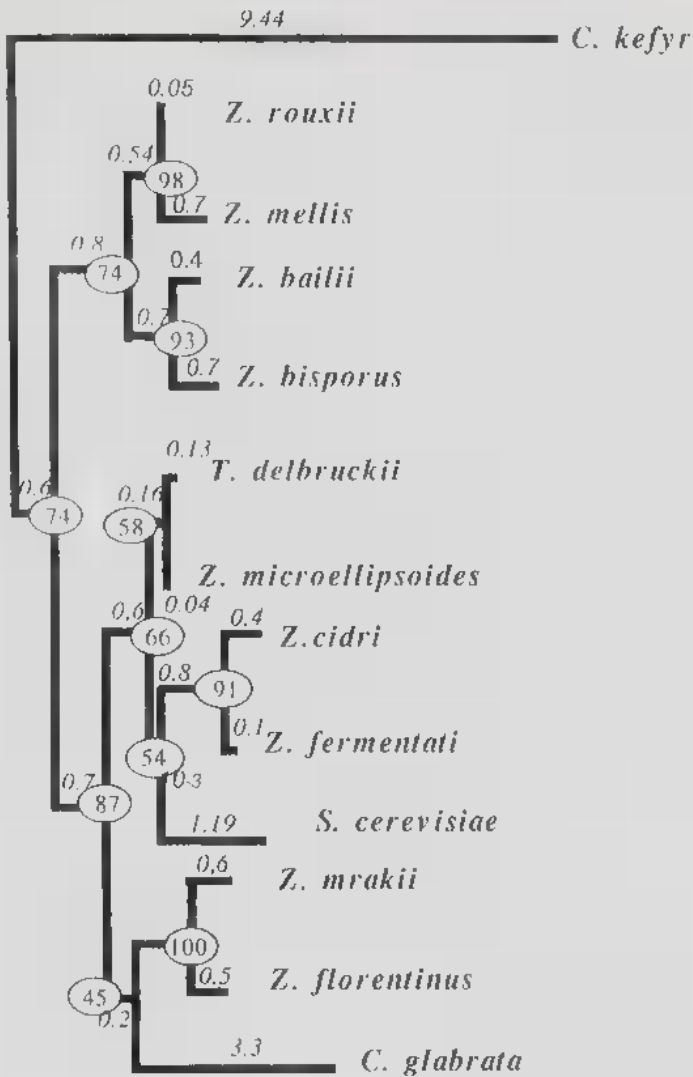


Figure 3 - Arbre phylogénétique obtenu par la méthode du NEIGHBOR-JOINING. Les chiffres encadrés indiquent la force des noeuds définie par bootstrap. La longueur des branches, représentées à l'échelle, est indiquée par les nombres en italiques. *C. glabrata* et *C. kefyra* ont été choisis comme groupe extérieur.

Figure 3 - Tree obtained with NEIGHBOR-JOINING method. Numeral within circle represent the node strength calculated by bootstrap. The branch lengths are drawn to scale and indicated by the numbers in italics. Tree were rooted by taking *C. glabrata* and *C. kefyra* as outgroup.